



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE CERTIFIÉE CONFORME

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le titre de propriété industrielle, correspondant à la demande ci-annexée, a été délivré le 02 avril 2004

Fait à Paris le 20 JUL. 2006

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

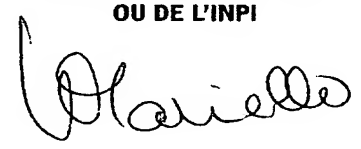


Remplir impérativement la 2ème page.

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 190600

REMISE DES PIÈCES DATE 18 JUIN 2001 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0107976 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 18 JUIN 2001		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE BREESE-MAJEROWICZ 3 avenue de l'Opéra 75001 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) 12543FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date ____/____/____	N° _____ Date ____/____/____
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____	Date ____/____/____
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) COMPOSITION PHARMACEUTIQUE POUR LE DIAGNOSTIC, LA PREVENTION OU LE TRAITEMENT D'UNE PATHOLOGIE TUMORALE, COMPRENANT UN AGENT MODULATEUR DE L'ETAT DE POLYMERISATION DE L'ACTINE			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Norm ou dénomination sociale		ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE CACHAN	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Adresse	Rue	61 avenue du Président Wilson	
	Code postal et ville	94235	CACHAN Cedex
Pays		France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE 18 JUIN 2001 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0107976 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI		DB 540 W / 190600	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>			12543FR		
6 MANDATAIRE					
Nom			BREESE		
Prénom			Pierre		
Cabinet ou Société			BREESE-MAJEROWICZ		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel					
Adresse	Rue	3 avenue de l'Opéra			
	Code postal et ville	75001	Paris		
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 47 03 67 77			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 47 03 67 78			
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		office@breese.fr			
7 INVENTEUR (S)					
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée			
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)			
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non			
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):</i>			
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) BREESE Pierre 921038				VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE 18 JUIN 2001

LIEU 75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0107976

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)

12543FR

**4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date / / N°

Pays ou organisation

Date / / N°

Pays ou organisation

Date / / N°

5 DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale

BIOALLIANCE PHARMA

Prénoms

S.A.

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

59 boulevard du Général Martial Valin

Code postal et ville

75015 PARIS

Pays

France

Nationalité

Française

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

5 DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

**10 SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)**

BRESE Pierre
921038

**VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI**

Blariello

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE POUR LE DIAGNOSTIC, LA
PREVENTION OU LE TRAITEMENT D'UNE PATHOLOGIE TUMORALE,
COMPRENANT UN AGENT MODULATEUR DE L'ETAT DE POLYMERISATION
DE L'ACTINE.

5

La présente invention concerne le domaine de la
cancérologie, elle s'appuie sur les observations de la
modification des certaines caractéristiques phénotypiques
cellulaires liées à la structure du cytosquelette, telles
10 que l'adhérence et la motilité, des cellules lorsque
lesdites cellules évoluent vers un phénotype tumoral.

Ces caractéristiques phénotypiques sont liées à
la structure du cytosquelette desdites cellules dont la
15 stabilité est assurée par la polymérisation des réseaux
d'actine qui le constituent.

L'invention est basée sur la corrélation
observée par la demanderesse entre la sous-expression de
20 gènes intervenant dans la stabilisation du réseau d'actine
du cytosquelette des cellules, comme par exemple la sous-
expression du gène de la zyxine et la transformation
phénotypique d'un phénotype normal versus un phénotype
tumoral desdites cellules.

25

L'invention est aussi basée sur la mise en
évidence, grâce aux travaux expérimentaux réalisés, que
l'administration d'une composition pharmaceutique capable
de stabiliser le réseau d'actine du cytosquelette de la
30 cellule, comme par exemple des composés induisant la
surexpression du gène de la zyxine dans une cellule
comportant un phénotype tumoral provoque la reversion
phénotypique de ladite cellule vers un phénotype normal.

35

Ces résultats ont permis de comprendre que la
structuration du cytosquelette via la dynamique de la
polymérisation de l'actine joue un rôle essentiel dans le
maintien du phénotype tumoral invasif et que par conséquent

une action pharmacologique ayant pour conséquence une augmentation de la quantité d'actine F à l'état stationnaire dans une cellule tumorale constitue un moyen de diminuer le caractère invasif de la cellule maligne, voire de rétablir un phénotype normal.

Ainsi, l'invention a pour objet l'identification de composés capables de moduler l'état de polymérisation de l'actine et l'utilisation desdits composés pour la préparation de médicaments utiles pour le diagnostic, la prévention et/ou le traitement de pathologies tumorales.

De tels composés capables de stabiliser le réseau d'actine peuvent être par exemple des inhibiteurs de la cofiline qui est une enzyme connue pour son action sur le mécanisme de dépolymérisation de l'actine F, sous sa forme active (cofiline déphosphorylée) elle induit la rupture d'hélices et favorise la dépolymérisation de l'actine F.

L'identification des gènes impliqués dans la transformation tumorale et dans le maintien du phénotype malin est un des éléments préalables à la conception de nouvelles approches thérapeutiques des pathologies tumorales. Les approches expérimentales pertinentes nécessitent la disponibilité de matériels biologiques constitués notamment de couples du type "lignée normale/lignée tumorale" ou "tissu normal/tissu tumoral". Ces couples permettent la réalisation de mesures d'expression différentielle.

Cependant, ces approches présentent des inconvénients, car la relevance des résultats dépend du caractère significatif des couples utilisés. Les lignées doivent présenter un phénotype bien caractérisé. Elles doivent présenter un phénotype immortel non tumoral et la transformation maligne des lignées immortelles devrait être

induite par un événement génétique unique. Enfin, on doit pouvoir obtenir aisément des révertants phénotypiques.

5 Les modèles les plus pertinents sont fournis par les phénotypes tumoraux induits par des protéines oncogènes de fusion telles que BCR-Abl, PML-RAR qui conduisent à des phénotypes leucémiques ainsi que EWS-Fli-1, responsable du sarcome d'Ewing.

10 Le sarcome d'Ewing est une tumeur d'origine neuroectodermique qui se caractérise par une translocation chromosomique impliquant la bande q12 du chromosome 22 remaniée avec la bande q24 du chromosome 11 : t(11 ; 22) (q24 ; q12) (Turc-Carel et coll., 1984) conduisant à la
15 formation d'un gène chimère associant le protooncogène *EWS* à un membre de la famille des gènes ETS. Les points de cassure associés à la translocation majoritaire t(11 ; 22) sont localisés dans une région de 7 kb appartenant au gène *EWS* pour le chromosome 22 et une région de 50 kb
20 appartenant à *FLI-1* pour le chromosome 11 (Zucman et coll., 1993). Le résultat de cette translocation chromosomique génère un dérivé du chromosome 22 où la partie 5' du gène *EWS* est associée à la partie 3' du gène *FLI-1* (Delattre et coll., 1992).

25 Le gène de fusion exprime la protéine chimère EWS-FLI-1 possédant des propriétés oncogéniques. Ainsi, la protéine chimère EWS-Fli-1 est capable de transformer des fibroblastes murins de type NIH3T3 en culture (Ohno et coll., 1993) et d'induire des tumeurs chez la souris
30 "nude". L'association des domaines N-terminal de EWS et C-terminal de FLI-1 est nécessaire à son pouvoir transformant (May et coll., 1993).

35 Dans le cadre de la présente invention, il a été développé un modèle d'étude constitué d'une part par des fibroblastes NIH3T3 murins normaux, immortels non tumoraux et d'autre part par des fibroblastes exprimant la protéine de fusion EWS-Fli-1 d'une manière constitutive et

présentant un phénotype tumoral chez la souris nude. Ce couple de cellules permet d'effectuer une évaluation de l'expression différentielle caractérisant l'acquisition du phénotype tumoral.

5

Cette évaluation a été faite à l'aide du " cDNA micro-array " de Clontech permettant d'apprécier simultanément l'expression de 588 gènes.

10

Dans une deuxième étape, des révertants phénotypiques stables ont été obtenus en infectant les cellules transformées par des vecteurs rétroviraux codant pour des ARN antisens dirigés contre le gène de fusion oncogène. Un deuxième couple de cellules (cellules tumorales/cellules révertantes non tumorales) a été ainsi obtenu et a pu faire l'objet d'une étude d'expression différentielle.

15

20

Les expériences réalisées dans le cadre de la présente invention ont ainsi permis d'identifier des gènes dont la variation d'expression est liée à l'expression de la protéine oncogène et à la nature du phénotype, de façon à fournir de nouveaux moyens de traitement, de prévention ou de diagnostic, des cancers.

25

30

Parmi les expériences effectuées dans le cadre de la présente invention, l'immunocoloration des filaments d'actine sur des fibroblastes montre que la transformation maligne desdits fibroblastes médiée par une protéine chimère EWS-Fli-1 se traduit par une profonde modification de la morphologie des fibroblastes avec notamment une diminution des points focaux. Ceci s'accompagne d'un remodelage du cytosquelette et notamment des réseaux d'actine polymérisée.

35

En particulier il est démontré que le phénotype tumoral est influencé par le taux d'expression de la zyxine et que la sous-expression du gène de la zyxine est une

condition suffisante pour transformer un fibroblaste normal en fibroblaste tumorigène.

On connaît que la zyxine est une protéine
comprenant des domaines LIM présente dans les plaques
d'adhérence focale des fibroblastes et les lamellipodes des
cellules d'eucaryotes supérieurs. Ces motifs LIM, en forme
de doigt de zinc sont impliqués dans les interactions de
type protéine-protéine. (Scheimechel et al. 1994. " The LIM
domain a new structural motif found in zinc-printer-like
proteins ". Trends Genet. 10: 315-320.

La zyxine est impliquée dans la régulation de
la polymérisation des filaments d'actine et a des
propriétés structurales et fonctionnelles en commun avec
ActA de *Listeria* (Golsteyn et coll., 1997). La zyxine est
supposée agir comme intermédiaire d'ancrage entre la
membrane plasmique via l' α -actinine et les intégrines et
les filaments d'actine. Elle est clairement impliquée dans
l'architecture du cytosquelette, l'adhérence et la motilité
cellulaire (Crawford et Beckerle, 1991). Structuellement
la zyxine comprend une région N-terminal riche en proline,
un peptide signal d'exportation nucléaire (NES), ainsi que
des régions riches en acides aminés Histidine et Cystéine
formant les motifs LIM dans la partie C-terminale. (Sadler
et al. 1992. " Zyxin and cCRP : Two interactive LIM domain
proteins associated with the cytoskeleton ". J.Cell.Biol.
119: 1573-1587).

Le mécanisme de la tumorigénese zyxine-
dépendante implique des modifications de la motilité, de
l'adhérence et de la signalisation liée aux interactions
cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire.

L'analyse de profils d'expression
différentielle effectuée avec le modèle d'étude ci-dessus,
a permis de vérifier que les modifications morphologiques
dépendantes de l'expression d'une protéine chimère EWS-Fli-

1 sont corrélées aux variations d'expression du gène de la zyxine.

Il a été ainsi constaté que la diminution de l'expression du gène de la zyxine, impliqué dans la stabilisation du réseau d'actine intervenant dans l'organisation du cytosquelette cellulaire est directement liée à l'acquisition et le maintien du phénotype tumoral et que l'induction de la surexpression desdits gènes conduit à la reversion du phénotype tumoral.

Ainsi, l'invention a pour objet de fournir de nouvelles compositions pharmaceutiques pour le traitement et la prévention des cancers comprenant des composés capables de stabiliser le réseau d'actine du cytosquelette d'une cellule pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des cancers.

Ces travaux ont aussi conduit au développement d'une méthode d'identification de composés anti-tumoraux capables de stabiliser le réseau d'actine du cytosquelette d'une cellule, basée sur la détection de la reversion du phénotype tumoral lié à l'expression de la zyxine.

La présente invention a donc pour objet une composition pharmaceutique pour le traitement, la prévention ou le diagnostic d'une pathologie tumorale, caractérisée en ce qu'elle comprend un agent actif capable de stabiliser le réseau d'actine du cytosquelette d'une cellule choisi dans le groupe comprenant :

- la protéine zyxine
- une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par le gène de la zyxine, un fragment de celui-ci ou leur séquence complémentaire, ou un acide nucléique anti-sens de ceux-ci,
- une cellule ou un ensemble de cellules surexprimant le gène de la zyxine ou une protéine codée par un fragment de celui ci.
- un inhibiteur de la cofiline.

Définitions

Dans le cadre de la présente invention on entend par fragment de la zyxine tout fragment polypeptidique de celle-ci capable de conserver la fonction biologique de la zyxine et en particulier sa fonction de stabilisation du réseau d'actine du cytosquelette.

On entend par fragment du gène de la zyxine, tout fragment d'acide nucléique de la zyxine et en particulier les ADNc dudit gène codant pour la zyxine et/ou les différents domaines fonctionnels de celle-ci, tels que ceux codant pour:

- la région N-terminal de la protéine riche en proline,
- le signal d'exportation nucléaire (NES)
- les régions formant les motifs LIM dans la partie C-terminale.

On entend par dérivé du gène de la zyxine tout acide nucléique modifié chimiquement, ou par recombinaison génétique mais conservant la fonction dudit gène, notamment sa capacité à coder pour un polypeptide, lorsqu'il est exprimé dans un hôte approprié, qui conserve les fonctions biologiques de la protéine zyxine et en particulier sa fonction de stabilisation du réseau d'actine du cytosquelette cellulaire. Des telles modifications comprennent par exemple, la modification, addition ou suppression de bases, par fusion avec d'autres acides nucléiques, comme par exemple des éléments régulateurs, ou des molécules chimères comprenant des ADNc hétérologues obtenues par fusion des ADNc correspondants selon des techniques connues de l'homme du métier.

On entend par dérivé de la protéine zyxine tout polypeptide modifié, par exemple chimiquement par association avec des groupement chimiques fonctionnels, lesdits groupements chimiques fonctionnels étant choisis

parmi les groupements capables de réaliser le couplage de ladite protéine ou d'un fragment de celle-ci soit à d'autres molécules, comme par exemple des marqueurs, de protéines porteuses en vue de la fabrication d'un immunogène, des enzymes, soit sur des supports solides, tels que des supports minéraux, ou des polymères organiques.

Un premier mode de réalisation de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant la protéine zyxine ou un fragment fonctionnel de celle-ci.

Selon ce premier mode de réalisation, la composition pharmaceutique de l'invention comprend la protéine zyxine ou des fragments fonctionnels de celle-ci associés à des vecteurs de transport choisis parmi le groupe comprenant des:

- systèmes lipidiques tels que les liposomes anioniques ou neutres, et notamment le liposomes à base de phosphatidylcholine (PC) ou dioleylephosphatidylcoline (DPE), les liposomes cationiques, notamment les liposomes à base de bromure de dioctadecyldiméthylammonium (DODAB) le bromure de dioleyleoxypropyl-triméthylammonium (DOTMA), le DOGS (Transfectam®), le DDPES etc., des émulsions cationiques telles que les émulsions à base d'huile de soja et de 1,2 diolcoyl-glycéro-3-triméthylammonium propane (DOTAP), etc.

- systèmes particuliers : à titre d'exemple et de manière non limitative, on peut citer soit des microparticules à base d'acide poly(lactide co-glycolide) (PLG, de bromure de cétylméthylammonium (PLG-CTAB), de PLG-PEI, ou de microparticules à base de PLG-poly-L-Lysine etc., soit des nanoparticules à base de chitosan, de nanoparticules de PLG, de gélatine, etc.

- systèmes polymères ou polyplex à base de poly-L-Lysine, de poly-éthylèneimine (PEI) les dendrimères

polyamidoamines, des polymères cationiques tels que le chitosan, le DEAE-dextrane, des copolymères de TMAEM (triméthylammonium ethylmétacrylate) et de N-2-hydroxypropyl)méthacrylamide (HPMA),

5

- systèmes peptidiques comme le peptide RAWA
- antibiotiques polyéniques cationiques comme les dérivés cationiques de l'Amphotéricine B.

10

Avantageusement, dans la composition pharmaceutique de l'invention, la zyxine est associée audits vecteurs de transport intracellulaires par des liaisons chimiques covalentes ou non covalentes.

15

Un deuxième mode de réalisation de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant comme agent actif une molécule d'acide nucléique comprenant un ADNc du gène de la zyxine, un fragment ou un dérivé de celui-ci.

20

Selon ce deuxième mode de réalisation, la composition pharmaceutique comprend un acide nucléique comprenant un ADNc du gène de la zyxine, un fragment ou un dérivé de celui-ci associé à un vecteur d'expression recombinant viral ou à un vecteur de transport non-viral de type particulière.

25

Dans le cadre de l'invention on entend par association entre l'agent actif et le vecteur de transport, soit la fixation dudit agent actif sur le vecteur de transport, comme par exemple par des liaisons non covalentes, par exemple de type hydrophobes, ou par des liaisons chimiques covalentes au moyen d'agents de couplage ou non, selon des techniques bien connues de l'homme du métier, soit l'insertion dudit composé actif dans un vecteur d'expression recombinant viral ou bactérien. Dans ce dernier cas, le composé actif est amené jusqu'à sa cible soit par infection avec des particules virales exprimant

30

35

ledit composé actif, soit par transfection avec des vecteurs d'expression recombinants capables d'exprimer le composé actif lors de leur intégration dans ladite cellule hôte.

5

Avantageusement, la composition pharmaceutique de l'invention comprend un vecteur d'expression viral recombinant comportant des éléments nécessaires au contrôle transcriptionnel ainsi qu'au contrôle de la traduction de la séquence d'un ADNc du gène de la zyxine lorsque ledit vecteur d'expression est introduit dans des cellules cible.

10

Avantageusement, la composition pharmaceutique de l'invention comprend un vecteur d'expression viral recombinant comportant des séquences de régulation, telles que des promoteurs constitutifs ou inductibles, voire des séquences non-codantes du gène de la zyxine, permettant l'expression de la zyxine dans les cellules de l'hôte auquel est administrée la composition de l'invention.

15

20

Avantageusement, la composition pharmaceutique de l'invention comprend un vecteur d'expression viral recombinant comportant des séquences de régulation choisies parmi des séquences LTRs, comme par exemple les séquences LTRs du virus de la leucémie de Moloney, sous la dépendance d'un promoteur du LTR en 5'.

25

De préférence, la composition pharmaceutique de l'invention comprend comme vecteur de transport intracellulaire, tout vecteur d'expression viral recombinant placé sous le contrôle de promoteurs de la cellule hôte permettant l'expression de la zyxine dans la cellule hôte selon des techniques de recombinaison génétique bien connues de l'homme du métier.

30

35

A titre d'exemple et de manière non limitative, on peut citer des vecteurs d'expression issus d'Adénovirus, de virus associés aux Adénovirus (AAV) recombinants, des

baculovirus ou des rétrovirus recombinants, et tout préférentiellement un vecteur de type lentivirus recombinant.

5 De manière tout à fait préférentielle la composition pharmaceutique de l'invention comprend un vecteur d'expression viral comportant des séquences de promoteurs, choisis par exemple et de manière non limitative parmi le promoteur CMV, le promoteur EF1 alpha
10 ou le promoteur PGK.

Selon un mode de mise en œuvre particulier, la composition pharmaceutique de l'invention comprend comme agent actif une cellule issue d'un patient atteint d'une
15 pathologie tumoral génétiquement modifiée pour exprimer le gène de la zyxine.

La composition pharmaceutique de l'invention est utile pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des pathologies tumorales.
20

La composition pharmaceutique de l'invention est utile pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies telles que des hémopathies malignes associées à des anomalies chromosomiques de la
25 région de localisation du gène de la zyxine 7q34/q35.

Aussi, la composition pharmaceutique de l'invention est utile pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'hépatocarcinomes, de cancers neuroectodermiques, du
30 sarcome de Ewing.

L'invention concerne aussi les vecteurs de transfert intracellulaire non-viraux et viraux associés à
35 l'agent actif, susceptibles d'être utilisés dans la composition pharmaceutique ci-dessus.

Un autre objet de l'invention se rapporte à un vecteur viral susceptible d'être utilisé dans une composition pharmaceutique définie ci-dessus.

5 Ainsi l'invention a pour objet un vecteur viral comprenant un ADNc codant pour le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui-ci.

10 Plus particulièrement le vecteur viral selon l'invention est choisi parmi un vecteur recombinant issu d'un Adénovirus, un virus associé aux Adénovirus (AAV) ou un rétrovirus.

15 Un troisième mode de réalisation de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant comme agent actif une cellule caractérisée en ce qu'elle est génétiquement modifiée pour surexprimer le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui-ci.

20 Avantageusement la surexpression du gène de la zyxine dans ladite cellule est obtenue soit par transfection d'une cellule avec des vecteurs d'expression comprenant un ADNc du gène de la zyxine soit par infection d'une cellule avec des particules virales exprimant ledit
25 gène de la zyxine.

30 De préférence, la composition pharmaceutique selon l'invention comprend à titre de principe actif une cellule choisie parmi une cellules souche, une cellule de la moelle osseuse, une cellules hématopoïétique ou une cellule d'hépatocarcinome génétiquement modifiée pour surexprimer le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui-ci.

35 Préférentiellement, la composition pharmaceutique de l'invention comprend comme agent actif une cellule CD34+ génétiquement modifiée pour surexprimer le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui-

ci.

Tout préférentiellement, la composition pharmaceutique de l'invention comprend comme agent actif une cellule issue d'un patient atteint d'une pathologie tumoral génétiquement modifiée pour exprimer le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui-ci.

L'invention a également pour objet une cellule génétiquement modifiée surexprimant le gène de la zyxine.

L'invention a également pour objet une cellule génétiquement modifiée sous-exprimant le gène de la zyxine.

Une telle cellule peut être obtenue, par exemple, à l'aide d'un ARN antisens ciblant l'AUG de la zyxine et introduit dans les cellules par l'intermédiaire d'un oligonucléotide de synthèse cloné dans la navette comprenant le vecteur de transport.

De préférence les cellules génétiquement modifiées selon l'invention sont choisies parmi une cellule souche, une cellule de la moelle osseuse, une cellule hématopoïétique ou une cellule d'hépatocarcinome.

Avantageusement les cellules génétiquement modifiées selon l'invention sont des cellules CD34+.

Selon un mode de mise en œuvre préféré, les cellules génétiquement modifiées selon l'invention sont issues d'un patient atteint d'une pathologie tumoral.

L'invention concerne également un mammifère transgénique non-humain comportant au moins une cellule génétiquement modifiée sous-exprimant le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui-ci.

L'invention a également pour objet un mammifère transgénique non-humain comportant au moins une cellule

génétiqnement modifié sous-exprimant le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui-ci.

L'invention concerne également une méthode d'identification de composés capables de stabiliser le réseau d'actine du cytosquelette d'une cellule, consistant à détecter une réversion phénotypique de l'expression de la zyxine induite par lesdits composés, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la mise en contact des composés à tester avec ladite cellule,

b) la quantification de l'expression de la zyxine dans ladite cellule.

Selon une mise en œuvre particulière de la méthode de l'invention, la quantification de l'expression de la zyxine est effectuée par comparaison de l'expression des ARN messagers de la zyxine dans ladite cellule en présence et en absence dudit composé à tester.

Selon une autre mise en œuvre particulière de la méthode de l'invention, la quantification de l'expression de la zyxine est effectuée par comparaison de l'expression de la protéine zyxine dans ladite cellule en présence et en absence dudit composé à tester

L'invention a également pour objet une méthode de diagnostic d'une pathologie tumoral comportant les étapes suivantes:

a) le prélèvement des cellules d'un patient,
b) la quantification de l'expression de la zyxine dans les cellules prélevées

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la méthode de diagnostic de l'invention, la quantification de l'expression de la zyxine est effectué par mesure de l'expression des ARN messagers de la zyxine.

Selon une autre forme de mise en œuvre de la méthode de diagnostic selon l'invention, la quantification de l'expression de la zyxine est effectuée par comparaison de l'expression de la protéine zyxine des cellules prélevées audits intervalles différents.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation de la méthode de détection d'une réversion phénotypique d'expression de la zyxine pour déterminer l'efficacité d'un traitement anti-tumoral chez un patient en mesurant l'expression du gène de la zyxine dans des cellules dudit patient obtenues à deux intervalles différents durant le traitement anti-tumoral de celui-ci.

Ainsi l'invention a pour objet une méthode d'analyse d'un phénotype tumoral d'un patient caractérisé en ce qu'elle comporte les étapes suivantes:

- a) le prélèvement des cellules du patient à deux intervalles de temps différents,
- b) la quantification de l'expression de la zyxine dans les cellules prélevées audits intervalles différents.
- c) la comparaison des deux niveaux d'expression pour constituer un profil différentiel phénotypique dudit patient.

Selon un mode de réalisation de la méthode d'analyse de l'invention, la quantification de l'expression de la zyxine est effectué par comparaison de l'expression des ARN messagers des cellules prélevés audits intervalles différents.

Selon un mode de réalisation de la méthode d'analyse de l'invention la quantification de l'expression de la zyxine est effectuée par comparaison de l'expression de la protéine zyxine des cellules prélevées audits intervalles différents.

L'invention concerne également l'utilisation d'une substance capable de rétablir les réseaux d'actine d'une cellule pour la préparation d'un médicament anti-tumoral.

5

L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'une telle substance pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des hémopathies malignes associées à des anomalies chromosomiques de la région de localisation du gène de la zyxine 7q34/q35.

10

L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'une substance pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des hépatocarcinomes ou des cancers neuroectodermiques.

15

L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'une telle substance pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention du sarcome de Ewing.

20

D'autres avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des travaux expérimentaux effectués par la demanderesse décrits dans la section Matériel et méthodes ci-après et dans laquelle on fait référence aux figures en annexe dans lesquelles:

25

- La figure 1 est un schéma des interactions entre la zyxine et ses partenaires cellulaires au niveau de la membrane plasmique.

30

- la figure 2 représente un schéma de la construction du vecteur de transport viral associé à la zyxine.

- la figure 3 montre les images des structures cellulaires révélées spécifiquement. La figure 3A montre des filaments d'actine révélés par marquage des cellules avec une sonde phalloïdine couplée au FITC. La figure 2B montre la localisation de la zyxine révélée par marquage

35

des cellules avec un anticorps anti-zyxine révélé avec un anticorps anti-IgG de souris couplé au TRITC.

- La figure 4A illustre les résultats du Northern blot avec la détection des ARNm zyxine, à partir de 10 μ g d'ARN total, par la sonde zyxine humaine de 250pb.

- La figure 4B est une représentation schématique de la navette rétrovirale contenant le cadre de lecture de la zyxine, des ARNm contenant le cadre ouvert de lecture de la zyxine humaine et des sondes néo/CMV et zyxine utilisées pour la révélation des Northern blot.

- La figure 5 illustre les résultats du Northern blot avec la détection de l'ARNm issu du LTR 5', à partir de 10 μ g d'ARN total déposé sur gel d'agarose dénaturant, par la sonde néo/CMV de 1081pb.

- La figure 6 montre les images du Western blot et d'immunodétection de la protéine zyxine dans les différentes lignées cellulaires à partir de 60 μ g d'extraits protéiques issus des différentes lignées cellulaires.

- La figure 7 illustre les images de Western Blot obtenues après immunoprécipitation des extraits protéiques la protéine EWS-FLI-1 extraite des clones E-F zyxine.

- La figure 8A représente la séquence de l'antisens.

- La figure 8B est un schéma de la construction de la navette rétrovirale exprimant l'antisens contre l'AUG de la zyxine.

- La figure 8C montre la détection par RTPCR de l'ARN antisens dirigé contre l'AUG de la zyxine.

- La figure 9 montre les images de Western blot et de l'immunodétection de la protéine zyxine à partir de 40 μ g d'extrait protéiques issus des différentes lignées cellulaires.

- la figure 10 est une représentation graphique de l'étude comparative des variations des taux d'expression des gènes, réalisée par macro-arrays, entre la lignée NIH3T3 et les lignées EWS-FLI, as zyxine 1 et as zyxine 2.

- la figure 10 illustre l'action de la cofiline

dans le mécanisme de dépolymérisation de l'actine F.

Matériel et méthodes

I - Corrélacion entre phénotype tumoral et sous-expression de zyxine.

1- Description et culture cellulaire

L'ensemble des lignées cellulaires est cultivé à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Mis à part les GP+envAm12, elles sont entretenues dans du milieu DMEM (GIBCO) supplémenté par 10% de sérum de veau nouveau-né (GIBCO) et d'antibiotiques (pénicilline à 100UI/mL et streptomycine à 100µg/mL).

La lignée EWS-FLI contient un ADNc codant pour la protéine de fusion EWS-FLI-1 dans son génome. L'expression de cette protéine est sélectionnée à l'aide de 2,5µg/mL de puromycine.

La lignée AS-A, réalisée par M. Hervy et coll., produit un petit ARN antisens dirigé contre l'ARNm codant pour la protéine EWS-FLI-1. Cette lignée est sélectionnée, en plus de la puromycine, de 1mg/mL de généticine. La généticine permet de sélectionner les cellules qui produisent le petit ARN antisens dirigé contre l'ARNm codant pour la protéine EWS-FLI-1. Les lignées NIH3T3 AS zyxine sont des cellules qui produisent un petit ARN antisens dirigé contre l'AUG de l'ARNm codant pour la zyxine. Elles sont cultivées dans un milieu supplémenté de généticine à 1mg/mL afin de sélectionner l'expression de l'antisens. Les cellules GP+env Am12, sont des cellules transcomplémentantes capables de fournir en trans les protéines codés par les gènes gag et pol, portées sur un plasmide, et env porté par un autre plasmide. Cette lignée est capable de produire des particules virales amphotropes. Cette lignée est cultivée dans un milieu contenant du DMEM et 10% de sérum de veau fœtal (GIBCO) supplémenté de pénicilline et streptomycine. Ces cellules sont sélectionnées à l'aide d'un mélange de trois composés (200µg/mL d'hygromycine B, 15µg/mL d'hypoxanthine,

250µg/mL d'acide mycophénolique) pendant deux semaines avant transfection par la navette rétrovirale.

2 - Immunofluorescence

5 Les cellules sont ensemencées sur des lames de verre jusqu'à ce qu'elles adhèrent (de 24H à 48H). Les cellules sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde 3% rincées au PBS et perméabilisées avec une solution PBS/0,2% triton X100. Les cellules perméabilisées sont saturées avec une solution PBS/2%BSA. Dans le cas de l'immunocoloration de la protéine zyxine, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire (anti-zyxine de J.Weiland) dilué deux fois pendant 40 min, rincées 3 fois 5 min au PBS et ensuite incubées avec l'anticorps secondaire anti IgG de souris couplé au Texas Red (TRITC) pendant 40 min. Pour l'immunocoloration de l'actine les cellules sont incubées directement avec de la phalloïdine couplée au FITC pendant 40 min. Les lamelles sont observées au microscope à fluorescence.

20

3 - Construction :

3.1 - Génération du vecteur pLNCX ADA (adaptateur) à partir du pLNCX.

25 Le vecteur rétroviral pLNCX contient d'une part les séquences LTRs et la séquence psi issues du virus de la leucémie murine de Moloney (MoMLV) et d'autre part le gène de résistance à la néomycine, conférant la résistance à la généticine, sous la dépendance du promoteur du LTR en 5'. Ce vecteur contient aussi un site de multiclonaage (MCS) directement sous la dépendance du promoteur précoce du cytomegalovirus (pCMV). Le vecteur pLNCX est digéré par *HindIII*/*ClaI* au niveau du MCS pour y insérer une séquence contenant deux adaptateurs qui sont capables de s'autoassocier de façon complémentaire. Entre ces deux adaptateurs, cette séquence contient d'autres sites de restriction uniques dont *NsiI* et *SalI*.

30

35

3.2 - Génération d'un vecteur rétroviral codant pour la zyxine humaine.

Le plasmide pzyxine GFP contient l'ADNc codant pour la zyxine humaine couplé en phase au gène de la "green fluorescent protein" GFP (donné par M. Beckerle). Il est digéré par *Hind III* et *BamH I* puis cloné dans le vecteur PLNCX au niveau du MCS (*HindH I/BglIII*); *BamHI* et *BglIII* sont des sites compatibles. La digestion par *Hind II/BglIII* élimine l'un des deux adaptateurs, ceci empêchant une autoassociation de l'ARN codant pour la zyxine produit par ce vecteur.

Le résultat de cette construction est un vecteur rétroviral nommé pLNCX ADA zyxine, codant pour la zyxine humaine sous l'influence directe du pCMV.

3.3 - Génération d'un vecteur produisant un antisens dirigé contre la zyxine: pLNCX ADA as zyxine

pLNCX ADA sa zyxine est un vecteur qui a la capacité de produire un petit ARN en structure tige boucle dirigée contre l'AUG de l'ARNm codant pour la zyxine, directement sous la dépendance du promoteur pCMV.

La construction du vecteur est réalisée en insérant au niveau des sites *NsiI* et *Sal I* du MCS une petite séquence dirigée contre l'AUG de l'ARNm de la zyxine.

4 - Transfection

La navette rétrovirale du vecteur est transformée en virus correspondant en transfectant le vecteur rétroviral dans une lignée de cellule transcomplémentante GP+envAM12 (GPA). La lignée transcomplémentante GPA est transfectée par la navette rétrovirale (pLNCX zyxine ou PLNCX ADA as zyxine) en présence de Superfect (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

Les cellules exprimant le gène néo^r sont sélectionnées dans un milieu contenant 1µg/mL de G418. Les cellules résistantes sont recueillies, amplifiées et

ensemencées en flacon de 75cm² à raison de 2.10⁶ cellules. Deux jours après, le milieu est remplacé par un milieu non sélectif. Le surnageant est récolté toutes les 24 heures pendant 3 jours, regroupé, aliquoté et congelé. Le titre rétroviral est évalué sur les cellules NIH3T3 après sélection des cellules à la généticine (1 mg/mL). Le surnageant viral des cellules GPA est ensuite utilisé pour infecter les cellules voulues avec une multiplicité d'infection de l'ordre de 0,1. Trois jours après l'infection, les cellules sont sélectionnées avec 1µg/mL de G418. Seules les cellules qui ont intégré la navette rétrovirale résistent au G418 et forment des clones qui sont isolés et amplifiées afin de produire des lignées de cellules permanentes.

5- Immunoprécipitation.

Les cellules adhérentes sont trypsinées, culotées et rincées au PBS. Les cellules sont lysées avec du RIPA froid (10mM Tris-HCL pH7,4, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X100, 0.5% Na déoxycholate, 0,1% SDS) en présence d'un mélange de protéase (Boehringer). Après 20min d'incubation sur roue à 4°C, les échantillons sont centrifugés 15 min à 14000 rpm. Les surnageants sont récupérés et la concentration en protéine est estimée par le test de Bradford. Un aliquot contenant 1,5 mg d'extrait protéique total est incubé 1h30 à 4°C avec 0,2 µg d'anticorps dirigé contre de domine C terminal de Fli-1 (Santa Cruz SC-356) et ensuite 1 heure avec 20µL d'un mélange de billes d'agarose couplées à la protéine A et de billes couplées à la protéine G (Sigma). Après trois lavages au RIPA froid, les billes sont remises en suspension dans 20µL de tampon Laemmli 2X et sont portées à ébullition pendant 10 min. Les échantillons sont ensuite analysés par un immunoblot classique utilisant pour incubation de l'anticorps primaire, une solution contenant 1µg d'anti-Fli-1 dans 5mL de TBS- 0,1% (v/v) Tween.

6 - Western blot

L'analyse du taux de production de la protéine zyxine est réalisée par Western blot sur un extrait de cellule total en utilisant comme anticorps primaire, l'anticorps anti-zyxine monoclonal de souris donné par J. Wehland dirigé contre la région située entre le NES et les domaines LIM. Cette membrane est révélée par un réactif chimioluminescent (Immunostar : Biorad).

7 - Analyse des ARN.

7.1 - Northern blot

L'extraction des ARN totaux des différentes lignées cellulaires est réalisée en utilisant la solution de lyse RNAlplus (Quantum Biotechnologie) selon les recommandations du fournisseur. Un aliquot de 10 µg d'ARN total est dénaturé dans une solution contenant 0,04 M MOPS pH7, 0,01M d'acétate de sodium, 2,2 M formaldéhyde et 50% formamide. Les échantillons sont analysés sur gel d'agarose dénaturé au formaldéhyde et transférés sur membrane de nylon chargé (Hybond N+: Amersham Pharmacia). La membrane est hybridée avec une sonde d'ADNc radiomarkée au [³²P] dCTP par amorçage aléatoire (random priming) (Prime-a-gene® labeling system: Promega) dans une solution de préhybridation contenant 5X SSC, 5X Denhart's, 0,1mg/mL d'ADN de sperme de saumon, 0,1 mg/mL d'ARN-t de levure, 0,1% SDS, 25 mM pH7 KH₂PO₄ et 50% formamide à 42°C toute la nuit. Le lendemain la membrane est rincée trois fois avec du SSC2X/ 0,1%SDS à température ambiante et une à deux fois à 42°C avec du 0,5 X SSC / 0,1% SDS. Les signaux de la membrane sont ensuite observés au phosphoImager.

7.2 - RT-PCR

Les ARN totaux sont produits par la même technique décrite ci-dessus. La qualité et propreté des ARN est vérifiée sur gel dénaturant. La rétrotranscription est réalisée à l'aide du kit Omniscript™ de Qiagen de manière spécifique à l'aide d'une amorce 20 mers LTR. Les conditions utilisées sont 10 ng d'amorce LTR, 2,5 mM dNTP,

1µg d'ARN total supplémenté de 20U d'inhibiteur de RNase (RNasin®), tampon RT et 40U de transcriptase inverse. Le mélange est incubé une heure à 37°C et 5 min à 94°C. Les produits de RT des ADNc spécifiques qui sont amplifiés par PCR à l'aide de deux autres amorces nommées as 1 et as 2. Les conditions réactionnelles sont 0,25mM dNTP, 100ng de chacune des amorces et 1/20^{ème} du produit de RT, 1,5mM MgCl₂, tampon Taq pol et 1U d'enzyme Taq pol (Perkin Elmer N801-0060). Les cycles utilisés sont 4 min 94°C et 30cycles (30s 94°C, 45s 61°C, 1 min 72°C) et 10 min à 72°C.

LTR: AGATATCCTGTTTGGCCAT

AS1: GCCGTGCATCATCCTGACTG

AS2: CTGTTCTGACCTTGATCTG

15 8 - Test de tumorigénicité

Les cellules provenant des différents clones à tester sont trypsinées, culotées et resuspendues dans du PBS stérile à raison de 5.10⁶ cellules par mL. Un aliquot de 200µL de cellules est injecté par voie sous cutanée chez des souris nudes âgées de 6 à 8 semaines, irradiées la veille à 5 Gray. Les souris sont élevées dans une atmosphère stérile et climatisée. L'observation du développement des tumeurs est réalisée chaque semaine durant 5 à 6 semaines.

25

9 - Expérience de macro-array

La carte d'expression des ADNc "Atlas cDNA expression Arrays" (Clontech) est réalisée selon les recommandations du fournisseur. Deux membranes de nylon identiques (n°7741-1) sur lesquelles sont déposés 588 échantillons d'ADNc de souris, correspondant à 588 gènes permet d'hybrider en parallèle les ADNc des deux lignées cellulaires différentes. Des informations concernant les 588 gènes sont disponibles sur le site Clontech (<http://www.clontech.com/atlas.genelist/search.html>). La préparation des sondes ADNc radiomarquées est réalisée par rétrotranscription avec du [³²P] dATP en utilisant le kit Clontech. L'hybridation est réalisée selon les instructions

du fournisseur. Les signaux sont observés au PhosphoImager.

RESULTATS

1 - Etude du rôle de la zyxine dans la transformation cellulaire induite par la protéine de fusion EWS-FLI.

1.1 - Etablissement de lignées EWS-FLI surexprimant la zyxine

La surexpression de la zyxine dans les cellules NIH3T3 exprimant la protéine de fusion EWS-Fli (EWS-FLI) a été réalisée par infection en utilisant la navette rétrovirale pLNCX. Le cadre de lecture ouvert correspondant à la zyxine, issu du plasmide pZyxine-GFP (figure 2), est introduit dans le site de muticlonage du plasmide pLNCX situé en aval du promoteur CMV. Ainsi, il a été obtenu le plasmide dénommé pLNCX-zyxine qui contient les deux séquences LTR (5' et 3'), la séquence PSI+ nécessaire à l'encapsidation de l'ARN rétroviral, le gène Néo^R responsable de la résistance à la généticine sous la dépendance du LTR5' et le cadre de lecture de la zyxine humaine sous l'influence du promoteur CMV (figure 2).

La production de virus est obtenue par transfection de ce plasmide dans une lignée d'encapsidation murine amphotrope dénommée GPA. Les cellules EWS-FLI sont infectées à l'aide du surnageant viral produit par les cellules GPA et sélectionnées en présence de Généticine.

Les clones ainsi obtenus sont dénommés E-F/Zyxine. L'étude par microscopie de fluorescence (figure 3) montre que les cellules EWS-FLI ont perdu les faisceaux de micro filament d'actine et la capacité à s'étaler, caractéristiques typiques des fibroblastes transformés (Pollack, R et coll ; 1975, Maness, P, E; 1981). En revanche, les cellules des clones E-F/ Zyxine ont partiellement récupéré la structure des microfilaments d'actine ainsi que la capacité d'étalement des cellules NIH3T3 (figure 4). De plus, ces cellules ne présentent plus la capacité de croissance en multicouches, typique des

cellules transformées. En parallèle de ces modifications de structure, on observe une relocalisation de la zyxine au niveau des plaques d'adhérence, dans les jonctions intercellulaires et le long des cables de stress (figure 3).

2 - Expression de l'ARNm de la zyxine dans les cellules E-F zyxine.

L'analyse par Northern Blot montre que l'ARN codant pour zyxine est plus faiblement exprimé dans la lignée tumorigène EWS-FLI que dans la lignée NIH3T3 (figure 4). Ce résultat confirme la différence d'expression observée précédemment, par microarrays, entre les cellules NIH3T3 et EWS-FLI. La taille attendue de l'ARNm zyxine humaine issu de la navette rétrovirale et exprimé à partir du promoteur CMV (2,2 kb) (figure 4B) est identique à celle de l'ARNm endogène de la zyxine. Il est donc très probable que l'augmentation de l'intensité de la bande que l'on observe, dans les trois clones E-F/zyxine, soit due à l'expression de l'ARN zyxine exprimé à partir de la navette rétrovirale. Par ailleurs un autre ARN de taille supérieure à 4,7kb est représenté uniquement dans les ARN issus des clones E-F/zyxine. Cet ARN a une taille comprise entre 5,5 et 6 kb compatible avec un ARN qui serait exprimé à partir du promoteur situé dans la région U3 du LTR 5' (5,7 kb) de la navette rétrovirale (figure 4B).

Pour vérifier cette hypothèse, un second Northern blot a été réalisé en utilisant une sonde (néo/CMV) de 1081pb, correspondant à un fragment de restriction issu du plasmide pLNCX ADA zyxine, capable de détecter uniquement l'ARN issu du LTR 5' (figure 5).

Le résultat présenté sur la figure 5, révèle une hybridation uniquement dans les clones E-F zyxine. En se référant à la position de l'ARN 28S, observable aux UV, la bande détectée est positionnée au même niveau que la bande indéterminée présente dans le Northern blot utilisant

la sonde zyxine. On peut donc en conclure que la navette rétrovirale produit deux ARN contenant la séquence zyxine, l'un issu du promoteur CMV et l'autre issu du promoteur présent dans le LTR 5'.

5

3 - Etude de la surexpression de la protéine zyxine exogène.

Pour déterminer si les clones E-F zyxine contenant l'ARN zyxine issu de la navette rétrovirale sont capables de produire la protéine correspondante, un Western blot immunorévélé par un anticorps anti-zyxine a été réalisé. Les résultats de cette expérience sont présentés sur la figure 6. Pour l'ensemble des lignées, on détecte une bande spécifique et unique d'une protéine de masse moléculaire légèrement supérieure à 80 kDa. Cette masse moléculaire est en accord avec la masse moléculaire apparente de la zyxine (82 kDa) décrite par Schmeichel et al., 1998. La sous expression de l'ARNm de la zyxine dans la lignée EWS-Fli par rapport à la lignée NIH3T3 se traduit par une diminution de la protéine correspondante.

De la même façon, la surexpression de la zyxine au niveau ARN des clones E-F zyxine 1, 2 et 3 se traduit par une restauration du taux de la protéine zyxine proche de celui la lignée NIH3T3. Ces résultats montrent donc une corrélation entre le taux d'ARN produit par les cellules et le taux de protéine exprimée. En conclusion, l'introduction de l'ADNc codant pour la zyxine dans les cellules transformées EWS-FLI, permet de restaurer le taux d'expression de cette protéine à un niveau comparable voir supérieur à celui des cellules parentales NIH3T3. La surexpression de la protéine zyxine est très probablement due à l'ARN exprimé à partir du promoteur CMV. En effet, dans le cas de l'ARN minoritaire issu du LTR 5', le cadre de lecture de la phosphotransférase APH (3')II (Davies et Smith, 1978), conférant aux cellules la résistance à la généticine est traduit. L'absence de séquence interne

d'initiation de la traduction empêche donc le cadre ouvert de lecture de la zyxine humaine, en aval, d'être traduit.

5 4 - Etude de l'expression de EWS-FLI-1 dans les clones E-F zyxine

En parallèle, il a été vérifié que les clones E-F zyxine étudiés conservent l'expression de la protéine EWS-FLI-1, responsable du caractère tumorigène.

10 Pour ce faire, une étude de l'expression de la protéine EWS-FLI-1 est effectuée par Western blot après immunoprécipitation des extraits protéiques des clones E-F zyxine (figure 7). Les résultats, présentés sur la figure 7, montrent une détection spécifique d'une protéine de masse moléculaire supérieure à 61 kDa. Cette masse est
15 compatible avec la masse moléculaire apparente de la protéine EWS-FLI-1 attendue (68 kDa). Sous cette bande, d'autres bandes apparaissent. Elles correspondent au produit de dénaturation de l'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation (chaînes lourdes (50 kDa) de
20 l'anticorps anti Fli-1).

La différence d'intensité détectée en présence de deux quantités différentes d'extraits protéiques montre que la quantité d'anticorps utilisé n'est pas limitante. Pour pouvoir comparer l'intensité des bandes correspondant
25 à la protéine EWS-FLI-1, la quantité de EWS-FLI-1 immunodétectée par la quantité d'anticorps anti-Fli-1 détectée a été corrigée. Les résultats présentés sous forme d'histogramme (figure 7B) indiquent l'absence de protéine EWS-FLI-1 dans la lignée NIH3T3 et une sous expression dans
30 la lignée AS-A (exprimant un antisens dirigé contre la séquence de jonction EWS-FLI) par rapport à la lignée EWS-FLI. Pour les clones E-F zyxine, la quantité de protéine EWS-FLI-1 est nettement supérieure à la quantité de protéine détectée dans la lignée AS-A non tumorigène et
35 reste comparable à la quantité présente dans les cellules EWS-FLI tumorigènes.

On peut supposer que ces cellules conservent une quantité suffisante de protéine EWS-FLI-1 pour induire

des tumeurs sous cutanées chez la souris nude. Ainsi, l'éventuelle perte de tumorigénicité des clones E-F zyxine ne sera pas due à une diminution de l'expression de la protéine EWS-FLI-1.

5

5 - Etude de tumorigénicité des clones E-F zyxine

10

La détermination de l'induction d'une perte une perte du phénotype malin chez la souris nude par la surexpression de la zyxine dans la lignée EWS-FLI est illustrée sur le tableau 1 ci-après.

Tableau 1

Développement des tumeurs chez la souris nude					
Temps écoulé après l'injection	1 semaine	2 semaines	3 semaines	4 semaines	5 semaines
NIH3T3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
EWS-FLI	0/4	1/4	4/4	4/4	4/4
AS-A	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4
E-F zyxine 1	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5
E-F zyxine 3	0/5	0/5	0/5	1/5	2/5

15

Ces résultats correspondent à l'étude du nombre de tumeurs développées chez la souris nude après injection sous cutanée de 10^6 cellules de différentes lignées cellulaires durant 5 semaines. Les cellules sont injectées 24 heures après l'irradiation des souris à 5 Gray

20

L'injection de cellules NIH3T3 n'entraîne pas de développement de tumeur. Cette lignée est utilisée en tant que contrôle négatif puisqu'elle est connue pour être non tumorigène. En revanche, pour la lignée EWS-FLI, connue pour être tumorigène, toutes les souris ont développé des tumeurs entre la 2^{ème} et la 3^{ème} semaine. En ce qui concerne l'étude de tumorigénicité du clone E-F zyxine deux cas de figure peuvent se présenter, soit il n'y a pas de

25

développement de tumeurs (trois souris sur cinq) soit on observe un retard dans le développement des tumeurs d'environ deux à trois semaines (deux souris sur cinq). L'analyse de ces tumeurs montre que l'ADN de la navette rétrovirale est toujours présent, en revanche, l'ARN exogène codant pour la zyxine n'a pas pu être détecté. Il apparaît donc que le développement de tumeurs retardées, dans les souris, est dû à une perte de l'expression de la protéine zyxine exogène.

6 - Etude de la sous expression de la zyxine dans l'acquisition du phénotype tumoral.

6.1 - Etablissement de lignées NIH3T3 sous-exprimant la zyxine.

Etant donné l'importance du taux d'expression de la zyxine dans le maintien du phénotype tumoral des cellules NIH3T3 transformées par la protéine de fusion EWS-FLI, la demanderesse a voulu déterminer les conséquences d'une diminution forcée de cette protéine dans des lignées cellulaires non tumorigènes. Pour ce faire, un petit ARN antisens ciblant l'AUG de la zyxine a été utilisé (figure 8 A). Cet ARN antisens a été introduit dans les cellules par l'intermédiaire d'un oligonucléotide de synthèse cloné dans la navette pLNCX au niveau des sites de restriction *NsiI*/*SalI* (figure 8B)

Dans les trois clones sélectionnés (en présence de G418 1 mg/ml) et qui ont été dénommés AS-ZYX 1, 2 et 3, l'expression de l'antisens (figure 8C) s'accompagne d'une diminution de la protéine Zyxine (figure 9). Cette diminution d'expression est du même ordre que celle que l'on détectait dans les cellules NIH3T3 transformées par la protéine de fusion EWS-FLI.

Cette diminution du taux d'expression de la zyxine dans les cellules NIH3T3 se traduit par un changement morphologique important des cellules. On peut ainsi observer une perte importante des expansions cytoplasmiques et d'adhérence ainsi que des modifications

notables de la structure des filaments d'actine (figure 3). Ces changements morphologiques, typiques de cellules transformées, s'accompagnent également de modifications dans les caractéristiques de multiplication de ces cellules. Ainsi, le temps de doublement de ces cellules (20-22 heures) est intermédiaire entre celui des cellules transformées EWS-FLI (17-18 heures) et celui des cellules parentales NIH3T3 (24-26 heures). Ces données indiquent également que les cellules AS-zyxine, comme les cellules EWS-FLI, ont perdu l'inhibition de contact.

6.2 - Etude de tumorigénicité des clones AS-zyxine.

Les tests de développement de tumeurs chez la souris nude corroborent les changements morphologiques et les modifications de croissance observés entre les cellules exprimant l'antisens dirigé contre la zyxine et les cellules NIH3T3 parentales (tableau 2). Il existe un léger retard dans l'apparition des tumeurs à partir des clones AS-zyxine par rapport à celui que l'on observe à partir de la lignée tumorale EWS-FLI, mais les trois clones développent des tumeurs. La vitesse de développement des tumeurs après l'injection de cellules EWS-FLI est également plus rapide que celle observée suite à l'injection des clones AS-Zyxine. Ces deux observations découlent vraisemblablement de la vitesse de multiplication intrinsèque des cellules.

Tableau 2

Développement de tumeurs chez la souris nude						
lignée	1	2	3	4	5	6
NIH3T3	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
EWS-FLI	0/4	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4
AS zyx1	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	3/4
AS zyx 2	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4	4/4
AS zyx 3	0/4	0/4	1/4	1/4	2/4	3/4

Tableau 2 : Test de tumorigénicité : étude du nombre de tumeurs développées après injection sous cutanée chez la souris nude de 10^6 cellules de différentes lignées cellulaires durant six semaines.

7 - Comparaison du profil d'expression des gènes entre la lignée NIH3T3, et AS-zyxine.

L'étude comparative de l'expression des gènes, par la technique de " cDNA expression Arrays ", entre les cellules NIH3T3 et les clones AS-zyxine 1 ou 2, montre que l'inhibition de la zyxine perturbe l'expression génique. Dix et treize gènes respectivement ont été identifiés dans les clones AS-zyxine 1 et 2 dont l'expression est modifiée par rapport au cellules NIH3T3 (figure 10). Parmi ces différents gènes, neuf sont communs aux deux clones.

Ces gènes peuvent être regroupés en quatre familles : les suppresseurs de tumeurs (EGR1 et p53), les protéines impliquées dans la réparation (ERCC-1), les protéines jouant un rôle dans la différenciation et la croissance cellulaire (ADAP, IGFBP-4, ICE) et les protéines intervenant sur la matrice cellulaire (TIMP2, PN-1 et urokinase plasminogen activator). De plus, neuf de ces gènes avaient été identifiés lors de l'analyse des profils d'expression entre la lignée NIH3T3 parentale et la lignée transformée par EWS-FLI (figure 10). Ces résultats montrent très clairement que le taux d'expression de la zyxine, dans les cellules utilisées, influence le processus de régulation génétique.

Discussion

Les travaux expérimentaux accomplis dans le cadre de la présente invention ont permis d'établir une relation entre le taux d'expression de la zyxine dans les cellules et l'acquisition ou le maintien du phénotype tumoral. L'étude du rôle de la zyxine dans la

transformation néoplasique a été réalisée à la suite de plusieurs observations indirectes :

5 A) l'acquisition du phénotype tumoral des cellules NIH3T3, suite à l'expression de la protéine de fusion EWS-FLI dans ces cellules, ainsi que la perte de tumorigénicité, du fait de l'extinction de cette protéine oncogène, s'accompagne de modifications morphologiques importantes (figure 3).

10 B) Le fait que la transformation maligne se traduit généralement par des modifications des capacités d'adhérence et de motilité. Ces modifications sont toujours reliées à une déstructuration des filaments d'actine. C) Parmi la dizaine de gènes identifiés comme étant directement sous la dépendance de la protéine oncogène EWS-FLI, la zyxine est le seul qui joue un rôle dans la structuration du cytosquelette, l'adhérence et la motilité cellulaire.

Afin d'établir un lien direct entre la zyxine et la transformation maligne, d'une part un vecteur permettant de rétablir l'expression de la zyxine a été introduit dans une lignée tumorale (EWS-FLI) et d'autre part un vecteur exprimant un antisens dirigé contre l'AUG de la zyxine a été introduit dans une lignée non tumorigène (NIH3T3). Les résultats obtenus montrent que la restauration de l'expression de la zyxine dans les lignées tumorales (figure 6) permet de diminuer considérablement le pouvoir tumorigène de ces cellules. Etant donné que la zyxine est une protéine très conservée (97% d'homologie entre l'homme et la souris) la différence de séquence entre la zyxine humaine et murine n'est très probablement pas à l'origine de ce phénomène.

De plus, l'inhibition sélective de l'expression de la zyxine dans les fibroblastes NIH3T3, non tumorigènes (figure 9), conduit à la transformation maligne de ces cellules. Plusieurs autres données indiquent qu'il existe un lien direct entre l'effet observé sur la transformation maligne et le taux d'expression de la zyxine. Certaines souris à qui l'on a injecté les cellules EWS-FLI

surexprimant la zyxine humaine ont développé des tumeurs. L'analyse de ces tumeurs montre que le vecteur permettant d'exprimer la zyxine est toujours présent, en revanche l'ARN codant pour la zyxine humaine n'est plus détecté (expérience non présentée). L'analyse comparative des microarrays entre la lignée parentale NIH3T3 et les clones qui en dérivent et qui sous expriment la zyxine ne permet pas de détecter de modifications d'expression d'autres protéines du microfilament telles que l' α -actinine, la tropomyosine, l'actine ou la vinculine ou des protéines du cytosquelette comme la tubuline ou la vimentine (figure 10).

Les résultats obtenus montrent clairement qu'il existe un lien direct entre le taux d'expression de la zyxine et la transformation maligne, bien que le mécanisme ne soit pas établi. Le cytosquelette d'actine, en association avec la membrane plasmique, s'organise en domaines spécialisés capables d'assurer des fonctions spécifiques dans la motilité (lamélipode), l'adhérence (plaque d'adhésion) ou l'interaction entre les cellules (plaque de jonction). Les études de microscopie de fluorescence (figure 3) montrent que la diminution d'expression de la zyxine dans les cellules se traduit par la mise en place d'un domaine du type lamélipode au détriment des plaques d'adhésions et de jonctions. Les filaments d'actine jouent un rôle essentiel dans la formation et le maintien de ces différents domaines, particulièrement dynamiques, qui nécessitent la formation et le désassemblage concomitant de différentes structures. Dans ces conditions, il est évident que la dérégulation d'un des éléments intervenants dans ces structures est suffisant pour perturber tout le système. La zyxine est un composant structural essentiel des microfilaments et des plaques d'adhésion et elle influence l'organisation de ces microfilaments (Crawford, A. W et coll.; 1992) ainsi que les propriétés d'adhésion (Macalma. T et coll.; 1996) et de motilité (Drees. B. E, et coll.; 1999) des cellules. Il est

donc possible que les modifications de structure des cellules, observées lorsque la zyxine est sous exprimée, suffisent à rendre ces cellules tumorigènes. Les modifications des paramètres d'adhérence des cellules se traduisent par une modification des interactions cellules/environnement avec pour conséquence une reprogrammation de l'expression de gènes clés responsables de modifications phénotypiques. Il a été ainsi observé que l'acquisition du phénotype tumoral induite, dans les cellules NIH3T3, par une diminution de la protéine zyxine, conduit à une modification de l'expression de gènes caractérisant le phénotype invasif, notamment une sous expression des gènes TIMP2 et Protéase nexin-1 (PN-1) et une surexpression de l'urokinase activateur du plasminogène (figure 10).

REVENDICATIONS

1) Composition pharmaceutique pour le traitement, la prévention ou le diagnostic d'une pathologie tumorale, caractérisée en ce qu'elle comprend un agent actif capable de stabiliser la polymérisation du réseau d'actine du cytosquelette cellulaire.

2) Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend un agent actif choisi dans le groupe comprenant :

- la protéine zyxine ou un fragment polypeptidique de celle-ci

- une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par l'ADNc du gène de la zyxine, un fragment de celui-ci ou leur séquence complémentaire, ou un acide nucléique anti-sens de ceux-ci,

- une cellule ou un ensemble de cellules surexprimant le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui ci.

- un inhibiteur de la cofiline.

3) Composition pharmaceutique selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend comme agent actif la protéine zyxine ou un fragment polypeptidique de celle-ci.

4) Composition pharmaceutique selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend comme agent actif une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par l'ADNc du gène de la zyxine, un fragment de celui-ci ou leur séquence complémentaire.

5) Composition pharmaceutique selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend comme agent actif une cellule ou un ensemble de cellules surexprimant le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui ci.

6) Composition pharmaceutique selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend comme agent actif un inhibiteur de la cofiline.

5

7) Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce que l'agent actif est associé à un vecteur de transport intracellulaire.

10

8) Composition pharmaceutique selon la revendication 7, caractérisée en ce que le vecteur de transport intracellulaire est choisi parmi un vecteur d'expression recombinant viral ou un vecteur de transport non-viral.

15

9) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que le vecteur de transport intracellulaire non-viral est choisi parmi un vecteur lipidique, particulaire, micro ou nanoparticulaire, polymère ou polyplex, ou antibiotique cationique.

20

10) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisée en ce que l'association entre l'agent actif et le vecteur de transport intracellulaire est effectué au moyen de liaisons non covalentes.

25

11) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce que l'association entre l'agent actif et le vecteur de transport intracellulaire est effectué au moyen de liaisons chimiques covalentes.

30

12) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que le vecteur de transport intracellulaire est un vecteur d'expression recombinant viral et en ce que l'association

35

entre l'agent actif et ledit vecteur de transport intracellulaire est une intégration dudit composé actif dans ledit vecteur d'expression viral.

5 13) Composition pharmaceutique selon la revendication 12, caractérisée en ce que le vecteur d'expression recombinant viral est choisi parmi un Adénovirus, un virus associé aux Adénovirus (AAV) ou un rétrovirus.

10

 14) Composition pharmaceutique selon les revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que le vecteur d'expression recombinant viral est un lentivirus ou un oncovirus.

15

 15) Composition pharmaceutique selon la revendication 5 caractérisée en ce la cellule surexprimant le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui-ci est choisie parmi une cellule souche, une cellule de la moelle osseuse, une cellules hématopoïétique, une cellule d'hépatocarcinome.

20

 16) Composition pharmaceutique selon la revendication 15, caractérisée en la cellule surexprimant le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui-ci est une cellule CD34+.

25

 17) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 2, 5, 15 ou 16, caractérisée en ce que la cellule génétiquement modifiée pour surexprimer le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui-ci est issue d'un patient atteint d'une pathologie tumoral.

30

 18) Un vecteur de transport intracellulaire non-viral caractérisé en ce qu'il comprend un agent actif défini à la revendication 2.

35

19) Un vecteur de transport intracellulaire selon la revendication 18 caractérisé en ce que l'agent actif est associé audit vecteur de transport au moyen de liaisons non covalentes.

5

20) Un vecteur de transport intracellulaire caractérisé en ce qu'il est constitué par un vecteur d'expression recombinant viral comprenant un ADNc codant pour le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui-ci.

10

21) Un vecteur de transport intracellulaire selon la revendication 20 caractérisé en ce que le vecteur d'expression recombinant viral est choisi parmi un Adénovirus, un virus associé aux Adénovirus (AAV) ou un rétrovirus.

15

22) Une cellule caractérisée en ce qu'elle est génétiquement modifiée pour surexprimer le gène de la zyxine.

20

23) Une cellule caractérisée en ce qu'elle est génétiquement modifiée pour sous-exprimer le gène de la zyxine.

25

24) Une cellule selon les revendications 22 ou 23, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi une cellule souche, une cellule de la moelle osseuse, une cellule hématopoïétique ou une cellule d'hépatocarcinome.

30

25) Une cellule selon l'une quelconque des revendications 23 ou 24, caractérisée en ce qu'elle est une cellule CD34+.

35

26) Une cellule selon l'une quelconque des revendications 23 à 25 caractérisée en ce qu'elle est issue d'un patient atteint d'une pathologie tumoral.

27) Un mammifère transgénique non-humain caractérisé en ce qu'il comporte au moins une cellule génétiquement modifiée sous-exprimant le gène de la zyxine ou un fragment fonctionnel de celui-ci.

5

28) Méthode d'identification de composés capables de stabiliser le réseau d'actine du cytosquelette d'une cellule, consistant à détecter une réversion phénotypique d'expression de la zyxine induite par lesdits composés, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

10

a) la mise en contact des composés à tester avec ladite cellule,

b) la quantification de l'expression de la zyxine dans ladite cellule.

15

29) Méthode d'identification selon la revendication 28 caractérisée en ce que la quantification de l'expression de la zyxine est effectué par comparaison de l'expression des ARN messagers de la zyxine dans ladite cellule en présence et en absence dudit composé à tester.

20

30) Méthode d'identification selon la revendication 28, caractérisée en ce que la quantification de l'expression de la zyxine est effectuée par comparaison de l'expression de la protéine zyxine dans ladite cellule en présence et en absence dudit composé à tester

25

31) Méthode de diagnostic d'une pathologie tumoral caractérisée en ce qu'elle comporte les étapes suivantes:

30

a) le prélèvement des cellules d'un patient,

b) la quantification de l'expression de la zyxine dans les cellules prélevées

35

32) Méthode de diagnostic selon la revendication 31, caractérisée en ce que la quantification de l'expression de la zyxine est effectué par mesure de

l'expression des ARN messagers de la zyxine.

5 33) Méthode de diagnostic selon la revendication 31, caractérisée en ce que la quantification de l'expression de la zyxine est effectuée par comparaison de l'expression de la protéine zyxine des cellules prélevées audits intervalles différents.

10 34) Méthode d'analyse d'un phénotype tumoral d'un patient, caractérisée en ce qu'elle comporte les étapes suivantes:

 a) le prélèvement des cellules du patient à deux intervalles différents,

15 b) la quantification de l'expression de la zyxine dans les cellules prélevés audits intervalles différents.

 c) la comparaison des deux niveaux d'expression pour constituer un profil différentiel phénotypique dudit patient.

20 35) Méthode d'analyse selon la revendication 34, caractérisée en ce que les intervalles correspondent à deux périodes différentes durant le traitement anti-tumoral d'un patient.

25 36) Méthode d'analyse selon la revendication 35, caractérisée en ce que la quantification de l'expression de la zyxine est effectué par comparaison de l'expression des ARN messagers des cellules prélevés audits intervalles différents.

30 37) Méthode selon la revendication 35, caractérisée en ce que la quantification de l'expression de la zyxine est effectuée par comparaison de l'expression de la protéine zyxine des cellules prélevées audits intervalles différents.

38) Utilisation d'un composé capable de

stabiliser la polymérisation des réseaux d'actine d'une cellule pour la préparation d'un médicament anti-tumoral.

- 5 39) Utilisation selon la revendication 38 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des hémopathies malignes associées à des anomalies chromosomiques de la région de localisation du gène de la zyxine 7q34/q35.
- 10 40) Utilisation selon la revendication 38, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'hépatocarcinomes.
- 15 41) Utilisation selon la revendication 38 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention de cancers neuroectodermiques.
- 20 42) Utilisation selon la revendication 38 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention du sarcome de Ewing.

Figure 1

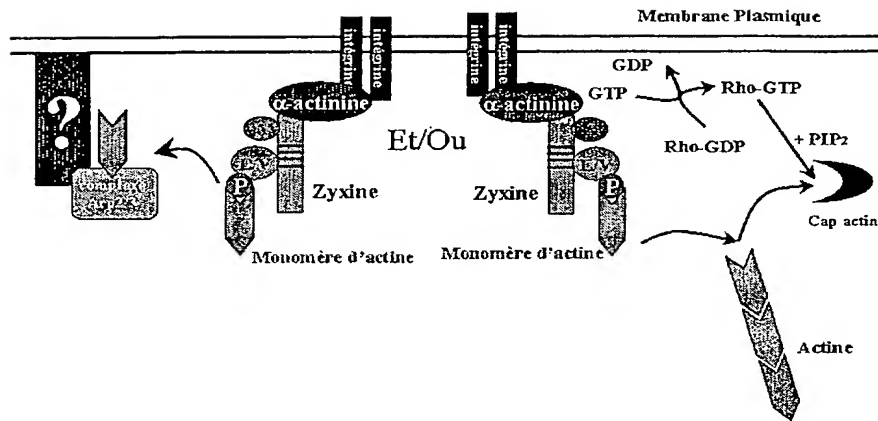


Figure 2

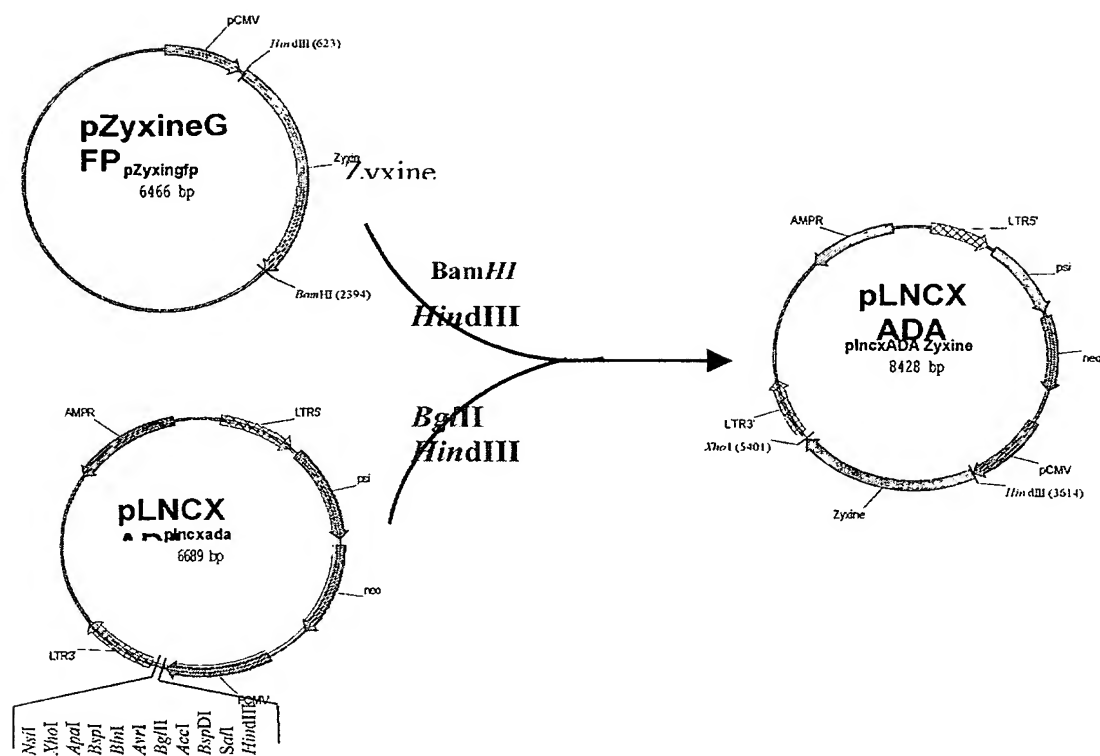
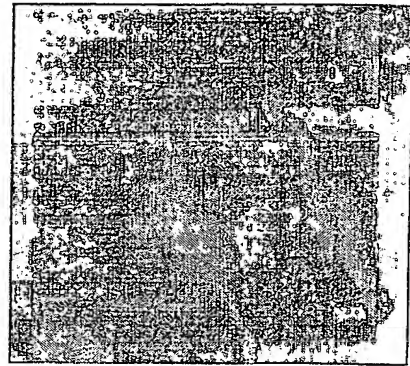
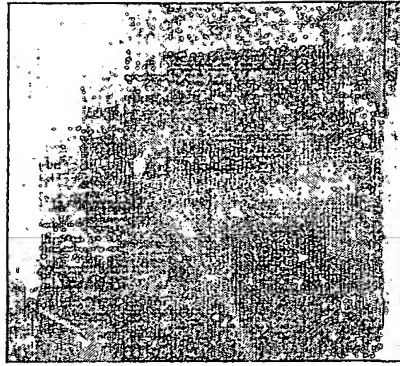


Figure 3A

Figure 3B

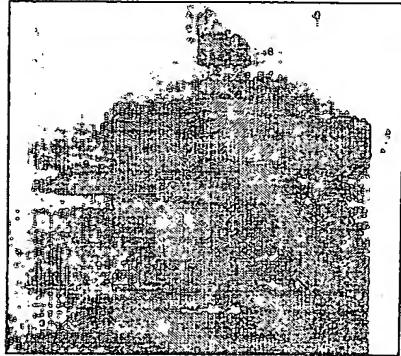
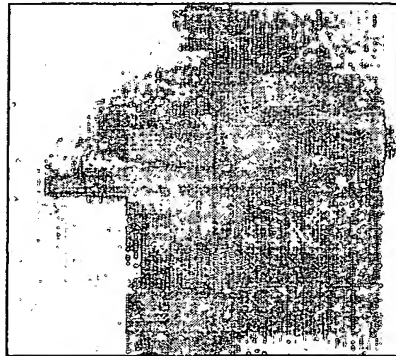
EWS-FLI



NIH3T3



E-F Zyxine



AS-Zyxine



Filament d'actine

zyxine

Figure 4

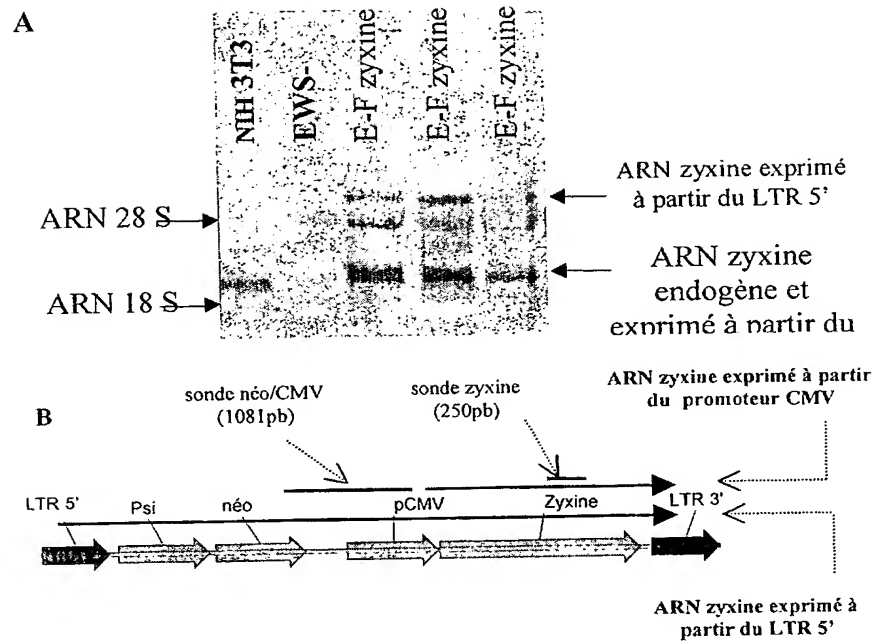


Figure 5

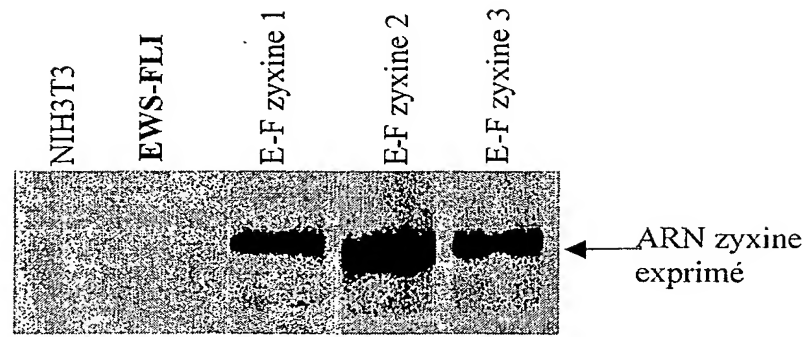


Figure 6

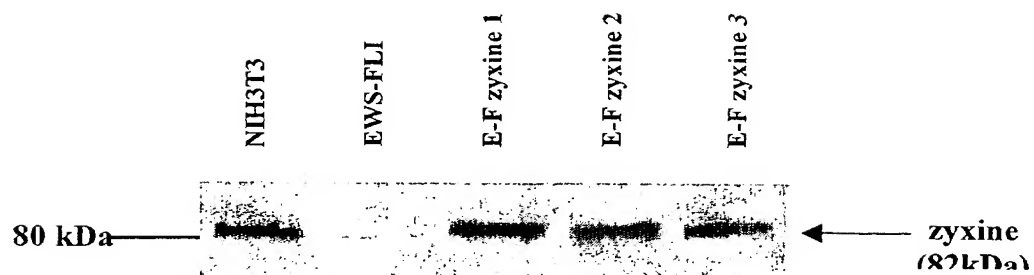


Figure 7

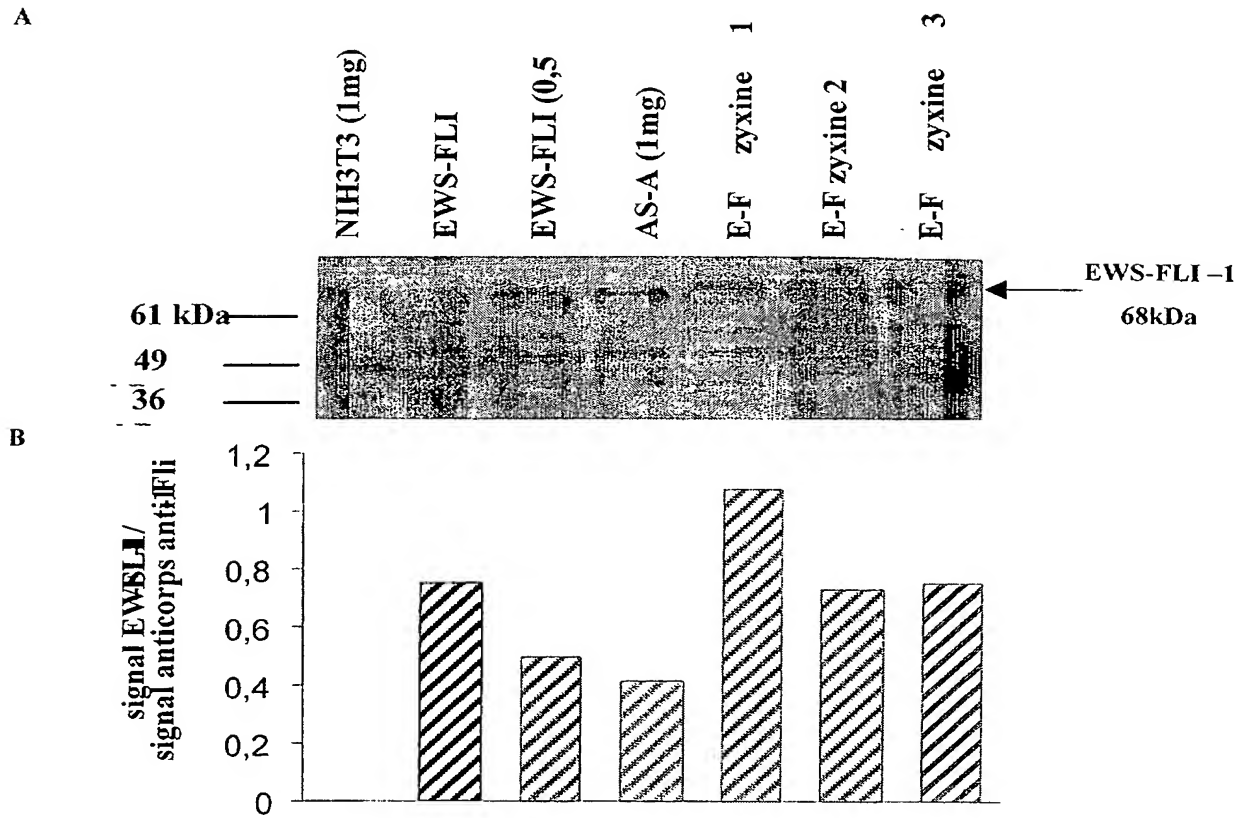


Figure 8

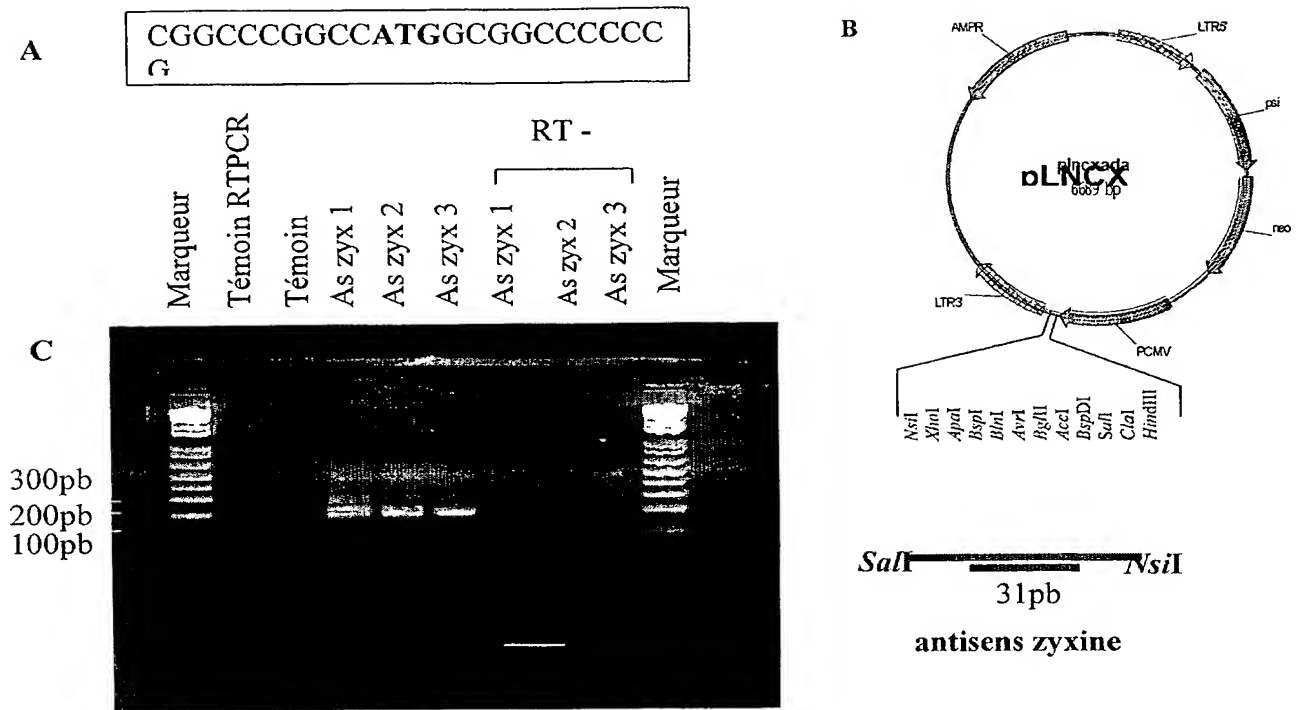


Figure 9

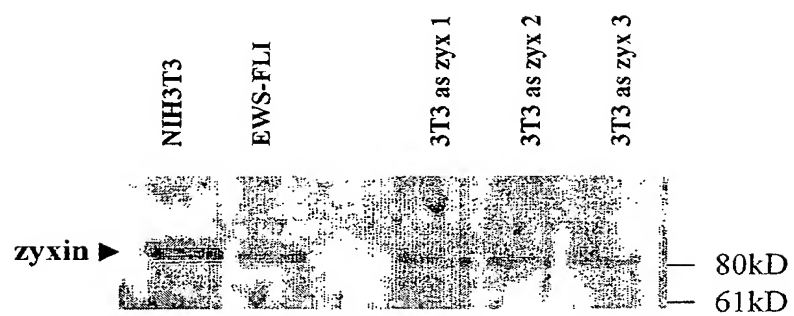


Figure 10



LISTAGE DE SEQUENCES

<110> BIOALLIANCE PHARMA S.A.
 ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

<120> Composition pharmaceutique pour le diagnostic, la prevention ou le traitement d'une pathologie tumorale comprenant un agent modulateur de l'état de polimérisation de la zyxine.

<130> b12543-bioalliance'-zyxine

<140> FR2001-xxxxxx

<141> 2001-06-19

<160> 3

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<221> amorce

<222> (1)..(19)

<223> amorce LTR pour la retrotranscription

<400> 1

agatatcctg tttggccat

19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<221> amorce

<222> (1)..(20)

<223> amorce AS1 pour l'amplification PCR

<400> 2

gccgtgcac atcctgactg

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> séquence artificielle

<220>

<221> amorce

<222> (1)..(20)

<223> amorce AS2 pour l'amplification PCR

<400> 3

ctgttcctga ccttgatctg

20



RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n' étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
<p>GOLSTEYN ROY M ET AL : "Structural and functional similarities between the human cytoskeletal protein zyxin and the ActA protein of <i>Listeria monocytogenes</i>." JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 110, no. 16, 1997, pages 1893-1906, XP001064431 ISSN : 0021-9533 * le document en entier *</p>	18, 22
<p>EP 0 821 960 A (HOECHST AG) 4 février 1998 (1998-02-04) * page 3, ligne 15 - ligne 20 * * page 5, ligne 17 - ligne 57 *</p>	1, 2, 6, 11, 18, 19
<p>CHAN AMANDA Y ET AL : "Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion." JOURNAL OF CELL BIOLOGY., vol. 148, no. 3, 7 février 2000 (2000-02-07), pages 531-542, XP002194594 ISSN : 0021-9525 * le document en entier *</p>	1, 2, 6, 11, 18, 19
<p>MACALMA TERESITA ET AL : "Molecular characterization of human zyxin" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 49, 1996, pages 31470-31478, XP002176724 ISSN : 0021-9258 * le document en entier *</p>	18, 20, 22
<p>HIROTA TORU ET AL : "Zyxin, a regulator of actin filament assembly, targets the mitotic apparatus by interacting with h-warts/LATS1 tumor suppressor." JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 149, no. 5, 29 mai 2000 (2000-05-29), pages 1073-1086, XP002194595 ISSN: 0021-9525 * le document en entier *</p>	22
<p>DREES B ET AL : "Characterization of the interaction between zyxin and members of the Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein family of proteins" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 29, 21 juillet 2000 (2000-07-21), pages 22503-22511, XP002176726 ISSN : 0021-9258 • le document en entier *</p>	22

**2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT
L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL**

WO 99 11814 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR ; PIERCE DANIEL (US) ; SPUDICH JAMES (US)
11 mars 1999 (1999-03-11)

GOLSTEYN R M ET AL : "LES PROTEINES DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE : BIEN PLACEES POUR
LA MOTILITE"
M/S MEDECINE SCIENCES,
vol. 16, no. 6/7, 2000,
pages 722-731, XP001010143
ISSN : 0767-0974

YONEZAWA N ET AL : "INHIBITION OF THE INTERACTIONS OF COFILIN DESTRIN AND DNASE I
WITH ACTIN BY PHOSPHOINOSITIDES"
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,
vol. 265, no. 15, 1990,
pages 8382-8386, XP002194596
ISSN : 0021-9258

SINHA P ET AL : "Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma
(stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of
drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas."
ELECTROPHORESIS, (1999 OCT) 20 (14) 2952-60.,
XP001064476

WO 01 71356 A (FRADELIZI JULIE ; GOLSTEYN ROY M (FR) ; INST CURIE (FR) ; LOUVARD DAN)
27 septembre 2001 (2001-09-27)

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA
PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2. .

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		12543FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		01 07976	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
COMPOSITION PHARMACEUTIQUE POUR LE DIAGNOSTIC, LA PREVENTION OU LE TRAITEMENT D'UNE PATHOLOGIE TUMORALE, COMPRENANT UN AGENT MODULATEUR DE L'ETAT DE POLYMERISATION DE L'ACTINE			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
ECOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DE CACHAN 61 avenue du Président Wilson 94235 CACHAN Cedex		BIOALLIANCE PHARMA (S.A.) 59 boulevard du Général Martial Valin 75015 PARIS	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		AUCLAIR	
Prénoms		Christian	
Adresse	Rue	22 avenue Parmentier	
	Code postal et ville	75011	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		AMSELLEM	
Prénoms		Valérie	
Adresse	Rue	103 avenue Philippe-Auguste	
	Code postal et ville	75011	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		HERVY	
Prénoms		Martial	
Adresse	Rue	5 rue de l'Amiral Mouchez	
	Code postal et ville	75013	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
Le 18/06/2001			
BREESE Pierre 921038			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2. .
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		12543FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0107976	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
COMPOSITION PHARMACEUTIQUE POUR LE DIAGNOSTIC, LA PREVENTION OU LE TRAITEMENT D'UNE PATHOLOGIE TUMORALE, COMPRENANT UN AGENT MODULATEUR DE L'ETAT DE POLYMERISATION DE L'ACTINE			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
ECOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DE CACHAN 61 avenue du Président Wilson 94235 CACHAN Cedex		BIOALLIANCE PHARMA (S.A.) 59 boulevard du Général Martial Valin 75015 PARIS	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		SUBRA	
Prénoms		Frédéric	
Adresse	Rue	3bis rue d'Athènes	
	Code postal et ville	75009	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
Le 18/06/2001			
BRESE Pierre 921038			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.